

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* SISOMICIN

Publication number: JP55156593 (A)

Also published as:

Publication date: 1980-12-05

JP61023996 (B)

Inventor(s): FUJII TADAYO; SATOI SHIYUZO; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU +

JP1355900 (C)

Applicant(s): TOYO JOZO KK +

Classification:

- international: A61K35/74; A61P31/04; C12P1/06; C12R1/01; A61K35/66; A61P31/00; C12P1/06; (IPC1-7): A61K35/74; C12P1/06; C12R1/01

- European:

Application number: JP19790060022 19790515

Priority number(s): JP19790060022 19790515

Abstract of JP 55156593 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, sisomicin, by culturing sisomicin-producing fungi belonging to *Dactylosporangium* genus. **CONSTITUTION:** Fungi capable of producing an antibiotic substance, sisomicin, and belonging to *Dactylosporangium* genus, e.g. *Dactylosporangium* *halitundense* G387, are cultured in a conventional cultivation medium at 25-35 deg.C for 100-200h under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the elute is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin.; The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, sisomicin.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑪ 特許出願公開

昭55—156593

5)Int. Cl.³

識別記号

序内整理番号

④公開 昭和55年(1980)12月5日

C 12 P 1/06

6760—4B

A 61 K 35/74

ADZ

6617-4C

C 12 R 1/01

發明の数 1

審資請求 未請求

(全 7 頁)

54 抗生物質シソミシンの製造方法

静岡県田方郡大仁町三權685

特 照 54-60022

發明者 吳玉童

出 願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の
3

發明者 藤井忠代

發明者 小谷勝

三島市光ヶ丘15の4

静岡県田方郡大仁町田京727の
3

發明者 里井秀三

⑦出 願 人 東洋釀造株式会社

28

静岡県田方郡大仁町三福632の

發明者 武藤直紀

武藤南紀

問 題 表

1. 発現の名称

抗生物質シノミセンの製造方法

(4) タウチロスタランシウム基に属する抗生物質シノミシン生産菌を培養に培養し、その培養物より抗生物質シノミシンを採取することを特徴とする抗生物質シノミシンの製造方法。

(2) ダダチアス東ボランジウム菌に感染する抗生物質シソミシン生産菌が、ダダチアスボランジウム・タイランサンセタム67である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質シソミシンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、炭生物質シソミシンの新規な製造方法に関する。

従来より既生体質シジミシンの生産菌としては、ミクロモナスプラ・インシエンシイ(*Micromonospora insidiosa*) (郵公第 49-1559 特、特開第 456932 号)、ミクロモナスプラ・オミザイ(*Micromonospora omisai*) (郵公第 48

5299113】。ミクロモノスポラ・ジネネ
シス（Micromonopora gineensis）（附図24
—55頁95号、米國農務局401120号））、ミ
クロモノスポラ・バリエタス・ミダンプセンヌ
【Micromonopora var. heterocarpa ハンガリ
國特産168770号、J. Anticoll. 5: 1945
（1977）】が知られてゐた。そのように、
原生動物シシシ生動物はすべてミクロモノ
スポラ（Micromonopora）に属するものであり、
その形態的特徴は寄生態から變つて遊泳形を形
成するものであり、さらにミクロモノスポラ属は、
ミクロモノスポラ科（Micromonoporaceae）に属
する（Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology 第8版（1974））ものである。
た。

本菌明者は、和歌奈富士山の地土より分離した放線菌は、 67 が低生物質シンタンを産生、 14 が産生することを見出し、決定する通り、放線菌 G 3 67 がダクダスボランナム属 (*Dactylosporangium*) に属するもので、その形態的特徴は革生菌系に準

子のうを寄生し、胞子のう中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクテロスポランジウム属はアクチノプラネス科(Actinoplasmaceae)に属するもので、従来のミクロモノスポラ属とは分類学上、明らかに科の属階での相違が認められる微生物学シソニンの新属を形成することを見出した。

上記の菌株6367の肉眼的および顕微鏡的観察結果を各増培地上における観察は、次の通りであった。

(1) 形態的特徴

リンゴ酸カルシウム寒天培地[Bact. Rev. 21: 1(1957)]上、30℃、5-7日間培養し、観察した所見は次の通りである。

寄生源糸は曲線^波または屈曲状で、分枝をなし、で伸長し、分枝はせず、直径0.5-0.8μであり、気菌糸は形成しない。

菌性菌糸に、大きさ1.5-2.0×2.0-2.5μの球状または棒状物体の寄生が、寒天培地中に産つた状態でみられる。

- 3 -

基生菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子のうは球形で、寒天培地表面上に、1または複数に形成する。胞子のうの大きさは、1.0-1.5×4.0-6.5μで、中に3-4個の胞子があてに一列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、楕円形または梨形を呈し、大きさは1.0-1.5×1.5-2.5μであり、強性で芽状の鞭毛を有している。

(2) アミノピペリン酸組成

全菌体分析によるアミノピペリン酸は、ノゾー型およびノゾー型よりR値の低いもの(slow moving diaminopimelic acid)が検出された。

(3) 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30℃、1-4日間培養し、観察した所見は次の通りであり、0.1-1.0mm寒天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される以外は、気菌糸の形成は認められず、また胞子のうはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土寒天培地(1, J. gen. Microbiol. 5: 295(1968))上で、中程度であり、その他の培地上

- 4 -

ではわずか、またはほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラ・・・ヘーベニー・・・マニアル(Color Harmony Manual)第4版1958年(Container Corporation of America)による色の分類に準つたものである。

各種病害にみける生育状態

病 地	生 育	葉 生 病 点 の 色	可 知 性 色 素
シムス・ス・加藤寒天増地 (ワタメマン増地1) 寒	中程度さいし不良	アブリコト[Apricot(41e)]ないしタビオレンジ [Dusky Orange(41c)]	な し
グルコース・アス(19年寒天増地) (ワタメマン増地2) 寒	不 良	ブライト・メロン・イエロー[Bright Melon (51a)]ないしアブリコト(41e)	〃
グリセリン・アス(19年寒天増地) (15P増地5) 寒	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Me- lon Yellow(36a)]	〃
スター・ス・加藤寒天増地 (15P増地4) 寒	中程度さいし良好	メサト・オレンジ[Russet Orange(4nc)]ないし メサト・オレンジ(41c)	〃
オコウ・ス・寒天増地 (15P増地7) 寒	僅少ないし不良	アブリコト[Apricot(41e)]ないし・メロン・パ タル・オレンジ[Pale Pantel Orange(41c)]	〃
オー・ス・ミル寒天増地 (15P増地3) 寒	中程度さいし良好	オレンジ・ハスト[Orange Rust(4pe)]ないし メサト・オレンジ[Russet Orange(4nc)]	〃
ハート・ス・ス・漢源寒天増地 (15P増地2) 寒	〃	メイプル[Maple(41e)]ないし・ルンギン・タン [Lunggu Tan(4nc)]	メイプル(41e)ないし・ライト・ ブラウン[Light Brown (4ng)]
リンパ・ス・カルウム寒天増地	不 良	無 色	な し
保善寒天増地 (ワタメマン増地14) 寒	僅 少	〃	〃

- 6 -

ベント・寒天増地 (ワタメマン増地30) 寒	中程度さいし良好	メイプル(41e)ないし・メサト・タン(4nc)	メイプル(41e)ないし・ライト・ブラウン (4ng)
エマソン寒天増地 (ワタメマン増地78) 寒	中 程 度	メサト・オレンジ(41c)ないし・メイプル(41e)	メイプル(41e)
ハイ・ス・ス・ス・寒天増地 (ワタメマン増地32) 寒	中程度さいし良好	シナモン[Cinnamon(51e)]ないし・メイプル(41e)	メイプル(41e)ないし・ライト・メサト・ ブラウン[Light Spine Brown(41c)]
グルコース・イースト・エース寒天 増地 (ワタメマン増地29) 寒	中 程 度	メロン・イエロー[Melon Yellow(51a)]	な し
バトリン・イースト・エース寒天 増地 (15P増地6) 寒	僅 少	無 色	〃
土崎寒天増地	僅少ないし不良	〃	〃
ジャガイモ片 (ワタメマン増地40) 寒	中 程 度	タイムレッド[Time Red(51e)]ないし・銅 [Copper(51c)]	〃
ジャガイモ片・炭酸ハンサム	〃	〃	〃
エンジン片	僅 少	無 色	〃

- ① Wakeman, S. A. The Antimycotic Vol. 2, 1947 p. 527-534 Williams & Wilkins co.
 ② Infor. & Synt. 16: 215-240 (1966)
 ③ Antimicrob Agents and Chemother., 1963 p. 116 ~ 124

[N] 栄養的性状

生理的検査法は下記の通りである。

1) 炭素源の同化性

炭素源	P 及び G	同化
D-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	+	+
L-イノシトール	+	+
D-マンノース	+	+
D-マヌニトール	+	+
α-メリビトース	+	+
β-ラクトース	+	+
グルタミン	+	+
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレトニース	+	+
ラフィノース	+	+

L-ラムノース	+	+
D-リボース	+	+
L-アルギニン	+	+
D-グルビトール	+	+
シュクロース	+	+
D-キシロース	+	+
アロエトース	+	+
ザリニン	+	+
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イヌリン	+	+

+: 陽性, -: 陰性

※: プラズマ・ゾットリーアの無増殖地

参考文献: Inter. J. Syst. Bact., 21: 248, 2

47 (1971) による *M. luteus* の有増殖地

2) 生育基質試験: 20~40℃

3) 細菌性: ペプトン化および革膜とともに陽性

- 8 -

- 9 -

4) メタム黄色素の生成: 陰性 (コロニーおよびバクテリア・イーストスライス・鉄素増殖地)

5) スターチの加水分解: 陽性

6) セルロースの分解: 陽性

7) カゼインの分解: 陽性

8) チロシンの分解: 陽性

9) ユーゲンンの酸化: 陽性

10) 硫化水素の生成: 陽性

11) 硝化場の還元: 陽性

12) 生育 PH: PH 5.5~9.0

上記の通り、本菌は G 367 の特徴としては、基質素に指形の胞子のうを産生し、胞子のう中に胞子がたいて一列に並び、胞子に短長の鞭毛を有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラズマ科 (Actinoplanaceae) に属するものであつて、胞子のうが指形で、その中にたいて一列に胞子が形成されるものは、ダクタロスピラジウム属に属する。

さらに、本菌 G 367 は有増殖地上で、基質素が褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクタロスピラジウム・タイランゲンセ (*Dactylospira thalassigena*) [Arch. Microbiol., 5: 52 (1967)] に属するものと決定した。

よつて、本菌 G 367 を、ダクタロスピラジウム・タイランゲンセ G 367 と命名したものであつて、また本菌は工業技術院微生物工業技術研究所「申請特許発明第 40400 号」として登録したのであつた。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、ダクタロスピラジウム属に属する微生物物質シノミン生産菌を新規に知覚し、その培養および微生物物質シノミンを採取することとを特徴とする微生物物質シノミンの製造方法である。

次いで、本発明の微生物物質シノミン (以下、シノミンという) を製造するに当つて開示するは、上記のダクタロスピラジウム属に属するシノミン生産菌を通常の微生物の培養に使用する増殖

- 10 -

- 11 -

部分を得る用地にて好適に増産することによつて得られる。増産としては、固形増産または液体増産が用いられるが、特に大量生産のためには液体増産、特に水性増産が適当である。

増産の栄養素としては、微生物の培養に通常用いられるものが多く使用される。炭素源としては同化可能な炭素化合物であるが、例えばグルコース、シクロコース、マルトース、スターチ、デキストリン、麦芽糖などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばコーン、スチーブ、リカー、大豆粉、綿実粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキスを、リン酸塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に見じて使用される。

培養温度は菌が発育し、シロミシンを生成する範囲内で適宜変更し得るが、好適なものは25〜35度である。培養期間は、条件によつて多少

異なるが、通常100〜200時間程度であつて、シロミシンが最高濃度に達する時期を見計つて適宜の時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたシロミシン培養物の固体培養の培養物中において、シロミシンは固体部分に大部分抽出されている。

次いでこのシロミシン生産物の培養物からシロミシンを採取するのであるが、シロミシンは水溶性の塩溶性アミノ酸化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便である。また生産されたシロミシンはバナルス、アクリストC1219を溶媒として、通常の寒天板法により菌性区分の確認、および定量を行なつたものである。

シロミシンの分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなわちシロミシン生産物を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去して培養液を得るのであるが、シロミシンがアミノ酸化合物であるためにその培養物のpHを一旦酸性に調整し、これを中和して析出してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液

を陽イオン交換樹脂例えばアンバーライトMB3 (NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これより活性物質を2Nアンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を濃縮し蒸発、そのpHを調整し、陽イオン交換樹脂例えばCM-セルファックスC-25 (NH₄⁺型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0.5Nの濃度塩酸をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を得、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりシロミシンの精製白色粉末を産生培養物の液にて得られる。またこの液にして得られるシロミシンは薄層クロマトグラフにて単一スポットを示すものであることが簡便に示し得る。

このようにして得られた本発明のシロミシンの物理化学的性質を例示すれば次の通りであり、公知のシロミシンと異なりシロミシン生産菌の産生する公知化合物なるシロミシンと一致した。

(1) 分子量

447 (マウスセトアルより)

(2) 元素分析

C = 49.59%, H = 8.03%, N = 14.75%

(3) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} = +18.4^\circ$ (C = 0.5, H₂O)

(4) 紫外線吸収スペクトル

210〜400nmの領域において、吸収極大はなし。

(5) 溶解性

水に易溶、メタノールに溶解、クロロホルムに難溶、酢酸エチル、アセトン、ベンゼンに不溶。

(6) 生物反応

レミュー反応、ニンヒドリン反応

坂口反応、硝化第一級反応、モリータム反応

(7) 質量分析

シリカゲル (メルク社製、シリカゲル60)

クロロホルム; メタノール; 酢酸エチル

1:1:1の下層 R_f = 0.44

(8) 酸塩基の識別

培养基物質

図1 培養成分表 (M I C : 100)

スタフィロコッカス・アウレウス ATCC 4558 P	< 0.2
スタフィロコッカス・アウレウス M527	< 0.2
スタフィロコッカス・エプιδルマティス ATCC 12228	< 0.2
ブドウ球菌・コリネバクテリウム・ジフテリヤエフェス	1.4
サルモネラ ATCC 9541	5.6
コリネバクテリウム・ジフテリヤエフェス	< 0.2
エウエリヤ・リネリ	0.8
シトバクテリウム・ロイニゲイ GNS 46	0.8
ストレプトコッカス・エピデュラティス ATCC 10031	0.4
サルモネラ・エンテリカライティス・ゲルトルネリ	0.4
シゲラ・ノネカ	0.8
エンテロバクテリウム・フロギス ATCC 25922	0.4
シロートモナス・エルネステル ATCC 4361	0.8

これらの結果より、本発明にて得られた化合物が前記の刊行物記載のシゾミシンと同一物質であると認められた。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるもので

- 16 -

はない。

実施例 1

アモキシリン 1%、グルコース 1%、カゼイン水解物 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.1% を含有する培地 (PH 7.2) 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分散し、120℃、20 分間加熱殺菌した。本培地 100 ml に、各々 0.5 ml のシゾミシン・アモキシリン・グルコース・炭酸カルシウムを添加し、120℃ 時間温度培養した。次いでこれを上記と同組成の加熱殺菌した培地 20 ml を含有する 300 ml 容フラスコ・アモキシリン・グルコース・炭酸カルシウム 20 ml を含有する 300 ml 容フラスコ、50℃、72 時間、300 rpm、低分 20 ml の無菌空気条件下で通気培養した。次いでアモキシリン 5%、グルコース 0.5%、炭酸カルシウム 0.1%、炭酸カルシウム 0.1%、炭化カルシウム 1.5 ppm を含有する加熱殺菌した培地 (PH 7.2) 200 ml を含有する 250 ml 容タンクに上記の培養物 10 ml を移植し、50℃、120 時間、250 rpm、低分 100 ml の無菌空気条件下で通気培養した。

- 17 -

培養物約 100 ml を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養物よりシゾミシンを分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養物を、12 N 濃度水溶液にて PH 7 に調整し、30 分間蒸発した後、濃アンモニア水にて PH 7.6 に調整し、さらにこれに酢酸鉛としてパーライト (商品名) 4 mg を加えて加減し、次いで得られた培養液を、アンパライト 1 RC-50 (ローム・アンド・ハース社製) (4H₂O・4Na⁺) 10 ml を充てしめカラムにチャージし、凍乾した後、2 N アンモニア水 20 ml で溶出せしめ、その全溶出液を得、これを 100 ml まで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を 6 N 濃度水溶液にて PH 7.0 に調整し、これを、C-M-カプアツツン G-25 (ファルマ・ア・アイン・ケミカル社製) (NH₄⁺・500 ml) を充填したカラム (径 4 cm) にチャージして活性物質を溶出せしめた。その後該カラムを水洗後、0.35 N の濃度勾配

をもたせたアンモニア水 5 ml により溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分画した。各分画について、クロマトグラム・メタノール 28% アンモニア水 1:1:1 の下層を洗脱液とした薄層クロマトグラフィーを行ない、モノドリン糖体により目的物を検出した。その結果、第 210 分画より 228 分画がシゾミシンのみを含有したものであった。次いでこの画分を回収、併せて減圧濃縮し、次いで凍乾濃縮してシゾミシン 2.1 g を得た。

特許出願人 東洋薬品株式会社
代表者 伊東嘉士郎

手 続 補 正 書

昭和55年7月 / 日

特許庁長官 川 原 隆 雄 殿

1 事件の表示

昭和54年特許第60022号

2 発明の名称

微生物質シロミンの製造方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三浦632の1

名称 東 洋 薬 酒 株 式 会 社

代表者 伊 東 富 士 夫

4 補正命令の日付

自 記

5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の

6 補正の内容

明細書第2頁第3行〜4行の

「ミクロモノスポラ・バリエタス・ニグレタセン
ス」を

「ミクロモノスポラ・フルアレフ・バリエタス・

ニグレタセン」を訂正する

同第2頁第5行の

「*Micromonospora* var. *nigrescens*」を「*Micromonospora purpurea* var. *nigrescens*

」を訂正する

同第4頁第12行の

「*diaminoplasella*」を「*diaminoplasia*」を訂正する

同第4頁第19行の

「*J. gen. Microbia*」を「*J. gen. Microbia*」を訂正する

同第4頁第16行の

「セファデフタス」を

「セファデフタス」を訂正する

修正メモ